



O PAPEL DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs) NO GENE *G6PD* EM NÓDULOS TIREOIDIANOS INFECTADOS POR HSV-2: UM ESTUDO *IN SILICO*.

Palavras-Chave: CÂNCER DE TIREOIDE, G6PD, BIOINFORMÁTICA

Autores/as:

Sarah de Lima Saraiva Leão, Laboratório de Genética Molecular do Câncer, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-Unicamp)
Elisângela de Souza Teixeira, Laboratório de Genética Molecular do Câncer, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-Unicamp)
Antonio Costa Ferreira Filho, Laboratório de Genética Molecular do Câncer, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-Unicamp)
Israel de Oliveira Santana Torres, Laboratório de Genética Molecular do Câncer, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-Unicamp)
Prof.^a Dr.^a Laura Sterian Ward, Laboratório de Genética Molecular do Câncer, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-Unicamp)

INTRODUÇÃO

A crescente incidência de câncer de tireoide (CT) no Brasil parece se dever a vários fatores além do aumento de detecção (1). O estresse oxidativo (EO) é um dos elementos envolvidos na desregulação de vias relacionadas com o desenvolvimento neoplásico, tendo em vista a presença de desregulação energética e a geração de espécies oxidativas de potencial cancerígeno quando em excesso (2, 3). Nas células tireoidianas, há circulação constante de espécies oxidantes como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e iodeto (I⁻) decorrentes da síntese hormonal (2). Para que haja homeostase, é essencial a presença de um sistema antioxidativo eficiente que evite efeitos deletérios decorrentes do EO, e diversas enzimas tem papel fundamental na detoxificação tireoidiana (4-6). Dentre elas, destaca-se a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), catalisadora da síntese de NADPH que é cofator essencial a enzimas redutoras e ao balanço oxidativo (2, 7, 8). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *G6PD* estão presentes em cerca de 400 milhões de pessoas ao redor do mundo, sintomáticos ou não (9), e são categorizados em 5 classes de acordo com o grau de atividade enzimática (9-11). Tais SNPs podem afetar a integridade morfofuncional da G6PD e contribuir para o desenvolvimento do CT, uma vez que a enzima se insere na reprogramação metabólica e interage com fatores de transcrição que podem se associar à morte de células neoplásicas (6, 12, 13).

A infecção viral é outro fator estressor para o desenvolvimento cancerígeno de diversas patologias, um exemplo disso é a infecção pelo Herpes Simplex Vírus tipo 2 (HSV-2). Cerca de 13% da população mundial está infectada por HSV-2 (14) e, apesar de sua transmissão via sexual e o tropismo pelas regiões genital e orofacial (16), pode se difundir e atingir diversos órgãos. Nestes, pode promover processos neoplásicos, como o aumento no risco do desenvolvimento de carcinomas cervicais invasivos em mulheres soropositivas para HPV (15). Quanto à tireoide, nela, foi observado que o HSV-2 se associa a metástases linfonodais e à promoção do estresse oxidativo (OS) (17-22), este correspondendo a um mecanismo proposto para facilitar a replicação e a atividade dos herpesvírus (23-25). Além disso, as infecções virais regulam estrategicamente os processos celulares do hospedeiro e subvertem as defesas antivirais das células, inclusive parte de seu ciclo de vida (26), propiciando a progressão de eventos celulares patológicos.

São escassos os estudos explorando variantes de G6PD em nódulos tireoidianos e seu possível impacto na evolução neoplásica. Assim, este trabalho tem como objetivo selecionar potenciais SNPs danosos, favoráveis ao estabelecimento de um microambiente tireoidiano carcinogênico, buscando prever seus potenciais impactos na morfologia, função e estabilidade da G6PD. Feita esta investigação, pretende-se avaliar a presença de infecção viral por HSV-2 e sua possível relação com os polimorfismos estudados, verificando se há maior ou menor propiciação à entrada do vírus em células com enzimas G6PD anômalas.

METODOLOGIA

Para a realização da análise *in silico*, a sequência FASTA das isoformas da enzima G6PD (A e B) foram extraídas do UniProt (ID:P11413-3 e P11413, respectivamente) e os polimorfismos do tipo missense

foram recuperados do dbSNP presente na plataforma NCBI (National Center for Biotechnology Information). Todos os dados recuperados foram exportados para o Excel.

Para prever e analisar a patogenicidade de G6PD com precisão, 9 ferramentas de análise *in silico* foram usadas, incluindo SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) que fornece previsões dos efeitos das trocas de aminoácidos presente na sequência de proteínas. SIFT prevê os SNPs prejudiciais utilizando como base o grau de resíduos de aminoácidos conservados em comparação com as sequências montadas por meio de PSI-BLAST. Score de SIFT varia de 0 a 1, e pontuações $\leq 0,05$ são previstas pelo algoritmo como prejudiciais substituições de aminoácidos, enquanto pontuações $> 0,05$ são consideradas toleradas.

Após predição, as variantes classificadas como deletérias no SIFT, foram analisadas na plataforma PredictSNP1.0, consenso de nove ferramentas (SIFT, PolyPhen-1, PolyPhen-2, MAPP, PhD-SNP, SNAP, PANTHER, PredictSNP e nsSNPAnalyzer) que prevê alterações proteicas. A partir desta ferramenta, esta e as seguintes terão a análise em duas partes, primeiramente com a sequência FASTA da isoforma B, seguida da isoforma canônica A.

As variantes deletérias foram analisadas em ferramentas que preveem o impacto na estabilidade de proteínas e seu potencial patogênico (figura 1). Dentre elas, I-Mutant 1.0 e MUpro, duas ferramentas que avaliam se a substituição poderia alterar a estabilidade da proteína. A estabilidade das proteínas é o principal fator que afeta a função e a atividade das moléculas biológicas. A energia livre do desdobramento da proteína é crítica para a estabilidade da proteína. Portanto, o impacto da mutação na estabilidade da proteína poderia ser determinado com precisão estudando o efeito da mutação na energia livre. Tendo como parâmetro a diferença de energia livre de Gibbs ($\Delta\Delta G$) e a direção da mudança após a mutação de ponto único da proteína; pontuações positivas aumentam a estabilidade da proteína, enquanto uma pontuação negativa designa desestabilização.

As demais ferramentas, (PolyPhen 2, Provean, SNPs & GO, PMUT e PANTHER) analisam alterações estruturais e funcionais na proteína. A PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping v2) verifica os efeitos de cada substituição de aminoácido nas propriedades estruturais e funcionais da proteína G6PD através da aplicação de abordagens físicas e comparativas, fornecendo previsões precisas com três resultados possíveis, seja provavelmente prejudicial, possivelmente prejudicial ou benigno. Score varia de zero a 0,95. Analogamente, a ferramenta Protein Variation Effect Analyzer (Provean) prevê alterações nas funções da proteína por substituição ou indel, com base no agrupamento e alinhamento de sequências pontuação baseada. Variantes com pontuação menor que -2,5 são consideradas deletérias. A SNPs & GO é baseada na máquina de vetor de suporte, prevendo impacto das variações na proteína ao calcular informações funcionais provenientes do banco de dados Gene Ontology (GO). Valores de $p > 0,5$ para cada variante são previstos como causadores de doença. A PMUT, que prediz a natureza patológica da proteína anômala, baseia-se em mecanismo de rede neural e calculando *hot spots* mutacionais. PANTHER estima chance de impacto funcional calculando o tempo de preservação de um aminoácido na linhagem da proteína de interesse. Ao calcular o tempo em milhões de anos que um aminoácido foi preservado na linhagem proteica, proporcional à probabilidade de impacto funcional, tem-se que quanto maior o tempo de preservação, maior a chance de impacto.

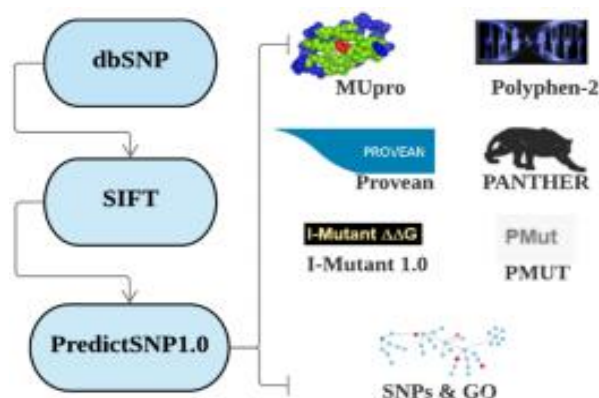


Figura 1 – Ferramentas utilizadas na análise *in silico*.
Autoria própria.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Dos 517 SNPs recuperados no dbSNP, que abrangem variantes das isoformas A e B, 127 foram deletérios (score $< 0,1$ e > 0) na plataforma SIFT Blink. Destes, 64 foram considerados deletérios com a pontuação do índice de tolerância 0,00 na plataforma SIFT e no PredictSNP 1.0, com acurácia esperada variando de 51% a 87%. No MUpro e I-Mutant 1.0, as 64 variantes tiveram sua estabilidade reduzida ($\Delta\Delta$

$G < 0$, oscilando entre -2,9 e -0,1 kcal/mol). Os resultados referentes as alterações estruturais e funcionais estão representadas no Diagrama 1. Das 64 variantes, 39 foram cumulativamente considerados como altamente deletérias em 100% das ferramentas analisadas.

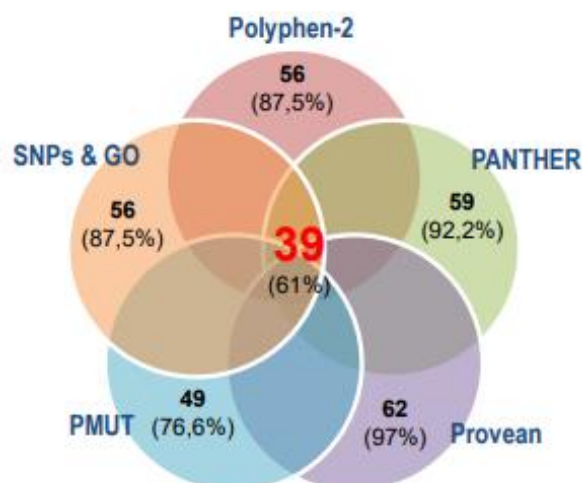


Diagrama 1 – Variantes classificadas como deletérias em ferramentas que analisam alterações estruturais e funcionais

Todos polimorfismos com potencial deletério (tabela 1) não apresentavam desequilíbrio de ligação. Além disso, para caracterizar e melhor compreender o papel dos polimorfismos previstos, foram utilizadas três bases de dados: LitVar, ClinVar e UniProt. A partir de buscas sobre as variantes proteicas, foi observado que 76,7% dos polimorfismos potencialmente deletérios foram previamente categorizados de acordo com o grau de atividade enzimática (G.A.E.). A partir de estudos moleculares, onde 33,3% foram de classe I (G.A.E.<1%), 20% de classe II (G.A.E. < 10%) e 23,3% de classe III (10%<G.A.E.<60%). Os restantes (23,3%) não passaram por tal categorização, ou mesmo não se encontram registrados e consolidados na literatura atual. Vale ressaltar ainda que, apesar da maioria dos polimorfismos apresentarem dados relativos à atividade molecular, grande parte dos estudos que fornecem tais resultados são antigos – datam da década de 1990 - ou escassos, demandando uma investigação mais aprofundada nas alterações de interesse em caso de análise futura em outros contextos.

Quanto à importância clínica, nota-se majoritário direcionamento dos trabalhos à genotipagem populacional, como a da G6PD Montalbano em povos italianos e a G6PD Orissa em povos indianos, e a acometimentos hematológicos, com destaque a anemias hemolíticas (destaque à G6PD A-) e sinais e sintomas delas decorrentes. No que tange à oncogenética, não há estudos que explorem o impacto dos polimorfismos abordados nesse trabalho, apenas investigações contemporâneas que estudam a G6PD selvagem e a via das pentoses como alvo terapêutico, inclusive em casos de câncer de tireoide.

SNP	Nome habitual	SNP	Nome habitual	SNP	Nome habitual
rs1050828	Asahi/A-	rs137852330	Coimbra	rs137852346	Aveiro
rs74575103	Montalbano	rs137852332	Nilgiri	rs137852347	Rehovot
rs78478128	Orissa	rs137852333	Ierapetra	rs137852349	Namoru
rs137852316	Nashville/ Anaheim	rs137852334	Guadalajara	rs267606836	Vancouver
rs137852319	Harilaou	rs137852336	Japan	rs138687036	Konan/Ube
rs137852323	Riverside	rs137852337	Pawnee	Rs387906468	-

rs137852324	Andalus	rs137852341	Quing Yuan/ Chinese-4	rs281860640	-
rs137852325	Puerto Limon	rs137852343	Nankang	rs387906467	-
rs137852327	Viangchan/ Jammu	rs137852344	Neapolis	rs387906470	-
rs137852328	Mexico City	rs137852345	Serres	rs387906471	-

Tabela 1 – SNPs da isoforma B/canônica da G6PD considerados potencialmente deletérios. Blocos preenchidos com (-) correspondem a informações ausentes nos bancos de dados utilizados.

Em suma, os achados correspondem a resultados reforçando potenciais SNPs danosos de G6PD e a escassez de dados na literatura científica referentes tanto aos polimorfismos quanto a sua exploração na carcinogênese tireoidiana. Associados, eles apontam para possibilidade de análise futura destes aspectos, como um potencial estudo para avaliação do impacto de alterações polimórficas no microambiente do câncer de tireoide.

Quanto à associação destes polimorfismos com infecção por HSV-2 e a evolução do câncer de tireoide, não houve até então estudo investigando esta relação específica. Entretanto, há trabalhos com a genotipagem de genes envolvidos no equilíbrio oxidativo de pacientes oncológicos infectados por vírus potencialmente oncológicos, os quais trazem resultados que apontam estes aspectos (polimórfico e viral) como fatores de risco sinérgicos e, em alguns casos, protetores. Dentre eles, há a observação de variantes da enzima NOX4 como fator protetor e variantes de GCLM como fator de risco em pacientes com carcinoma hepatocelular associado à infecção pelo vírus de DNA HBV (28). Foi relatado ainda que polimorfismos nos genes *GPX1*, *MPO* e *SOD2* conferem aumento no risco de linfoma Não-Hodgkin simultâneo à infecção pelo vírus de RNA HCV (29,30). Variantes da *SOD2* levam, inclusive, ao maior risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular associado à HCV (31). Outro achado foi o de que polimorfismos no gene *PRDX3* estariam associados ao risco de câncer cervical pelo vírus de DNA HPV (32). Tais informações reforçam a possibilidade de alterações no gene *G6PD*, cuja expressão se relaciona ao estresse oxidativo, terem impacto em nódulos tireoidianos infectados por HSV2.

CONCLUSÕES:

Ferramentas *in silico* sugerem que variantes no gene *G6PD* causam alterações funcionais e estruturais na proteína. Estas variantes patogênicas devem ser validadas em estudos práticos com nódulos tireoidianos para comprovar sua possível utilidade como marcadoras de risco para CT. Há intenção de análise futura do câncer de tireoide quanto à infecção por HSV-2 em situação de *G6PD* polimórfico, considerando o vírus como promotor de estresse oxidativo e a associação deste com a desregulação da homeostase, um possível fator de risco adicional no microambiente tireoidiano sem o equilíbrio oxidativo adequado.

AGRADECIMENTO

Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) – Bolsa de Iniciação Científica (2020-2021).

BIBLIOGRAFIA

1. Vaccarella S, Franceschi S, Bray F, Wild CP, Plummer M, Dal Maso L. **Worldwide Thyroid-Cancer Epidemic? The Increasing Impact of Overdiagnosis.** N Engl J Med. 2016;375(7):614-7.
2. Carvalho DP, Dupuy C. **Thyroid hormone biosynthesis and release.** Molecular and cellular endocrinology. 2017;458.
3. Hanahan D, Weinberg RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** Cell. 2011;144(5).
4. Ameziane El Hassani R, Buffet C, Leboulleux S, Dupuy C. **Oxidative stress in thyroid carcinomas: biological and clinical significance.** Endocrine-related cancer. 2019;26(3).
5. Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM. **Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis.** Mutation research. 2010;704(1-3).

6. Sun L, Suo C, Li ST, Zhang H, Gao P. **Metabolic reprogramming for cancer cells and their microenvironment: Beyond the Warburg Effect.** *Biochimica et biophysica acta Reviews on cancer.* 2018;1870(1).
7. Nelson DL, Cox MM. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** Artmed, 7ed, 2018.
8. Stanton RC. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival.** *IUBMB life.* 2012;64(5):362-9.
9. MPAC-WHO. **Updating the WHO G6PD classification of variants and the International Classification of Diseases, 11th Revision (ICD-11).** 2019.
10. Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. **Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency.** *Hematology/oncology clinics of North America.* 2016;30(2):373-93.
11. Group WW. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency.** *Bull World Health Organ;* 1989. p. 601-11.
12. Yang HC, Wu YH, Yen WC, Liu H, Hwang TL, Stern AhD. **The Redox Role of G6PD in Cell Growth, Cell Death, and Cancer.** *Cells.* 2019;8(9).
13. Guo L, Zhang Z, Green K, Stanton RC. **Suppression of interleukin-1 beta-induced nitric oxide production in RINm5F cells by inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase.** *Biochemistry.* 2002;41(50).
14. WHO. **Herpes simplex virus.** Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus#hsv2>.
15. Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Munoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. **Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer.** *Journal of the National Cancer Institute.* 2002;94(21):1604-13.
16. Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. **Virologia Humana.** Guanabara Koogan, 3 ed., 2015.
17. Jensen K, Patel A, Larin A, Hoperia V, Saji M, Bauer A, et al. **Human herpes simplex viruses in benign and malignant thyroid tumours.** *The Journal of pathology.* 2010;221(2).
18. Sartori G, Jardim NS, Sari MH, Flores EF, Prigol M, Nogueira CW. **Diphenyl Diselenide Reduces Oxidative Stress and Toxicity Caused by HSV-2 Infection in Mice.** *Journal of cellular biochemistry.* 2017;118(5).
19. Mathew SS, Bryant PW, Burch AD. **Accumulation of oxidized proteins in Herpesvirus infected cells.** *Free radical biology & medicine.* 2010;49(3).
20. Hu S, Sheng WS, Schachtele SJ, Lokensgard JR. **Reactive oxygen species drive herpes simplex virus (HSV)-1-induced proinflammatory cytokine production by murine microglia.** *Journal of neuroinflammation.* 2011;8.
21. Cymerys J, Chodkowski M, Słońska A, Krzyżowska M, Bańbura MW. **Disturbances of mitochondrial dynamics in cultured neurons infected with human herpesvirus type 1 and type 2.** *Journal of neurovirology.* 2019;25(6).
22. Gonzalez-Dosal R, Horan KA, Paludan SR. **Mitochondria-derived reactive oxygen species negatively regulates immune innate signaling pathways triggered by a DNA virus, but not by an RNA virus.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Feb 24;418(4):806-10.
23. Valyi-Nagy T, Olson SJ, Valyi-Nagy K, Montine TJ, Dermody TS. **Herpes simplex virus type 1 latency in the murine nervous system is associated with oxidative damage to neurons.** *Virology.* 2000;278(2):309-21.
24. Kavouras JH, Prandovszky E, Valyi-Nagy K, Kovacs SK, Tiwari V, Kovacs M, et al. **Herpes simplex virus type 1 infection induces oxidative stress and the release of bioactive lipid peroxidation by-products in mouse P19N neural cell cultures.** *Journal of neurovirology.* 2007;13(5):416-25.
25. Li X, Feng J, Sun R. **Oxidative stress induces reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and death of primary effusion lymphoma cells.** *Journal of virology.* 2011;85(2):715- 24.
26. Khan M, Syed GH, Kim SJ, Siddiqui A. **Mitochondrial dynamics and viral infections: A close nexus.** *Biochimica et biophysica acta.* 2015;1853(10 Pt B):2822-33.
27. Broad Institute. **Chapter 1 – Using Haploview 2008.** Disponível em: <https://www.broadinstitute.org/haploview/chapter-1-using-haploview>
28. Ma N, Liu W, Zhang X, Gao X, Yu F, Guo W, Meng Y, Gao P, Zhou J, Yuan M, Mi Y, Zhang L, Qi S, Li L, Wang L, Su Q, Yang L, Liu D. **Oxidative Stress-Related Gene Polymorphisms Are Associated With Hepatitis B Virus-Induced Liver Disease in the Northern Chinese Han Population.** *Front Genet.* 2020 Jan 8;10:1290.
29. Farawela H, Khorshied M, Shaheen I, Gouda H, Nasef A, Abulata N, Mahmoud HA, Zawam HM, Mousa SM. **The association between hepatitis C virus infection, genetic polymorphisms of oxidative stress genes and B-cell non-Hodgkin's lymphoma risk in Egypt.** *Infect Genet Evol.* 2012 Aug;12(6):1189-94.
30. Houldsworth A, Metzner M, Shaw S, Kaminski E, Demaine AG, Cramp ME. **Polymorphic differences in SOD-2 may influence HCV viral clearance.** *J Med Virol.* 2014 Jun;86(6):941-7.
31. Ezzikouri S, El Feydi AE, Chafik A, Afifi R, El Kihal L, Benazzouz M, Hassar M, Pineau P, Benjelloun S. **Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene is associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma in HCV-infected Moroccan patients.** *Mutat Res.* 2008 Jan 8;649(1-2):1-6.
32. Safaeian M, Hildesheim A, Gonzalez P, Yu K, Porras C, Li Q, Rodriguez AC, Sherman ME, Schiffman M, Wacholder S, Burk R, Herrero R, Burdette L, Chanock SJ, Wang SS. **Single nucleotide polymorphisms in the PRDX3 and RPS19 and risk of HPV persistence and cervical precancer/cancer.** *PLoS One.* 2012;7(4):e33619.